Aus dem Toxikologischen Institut der Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. H. Remmer

Über Veränderungen der Bildung von cyclischem Adenosin 3',5'- Monophosphat in Gehirnschnitten der Ratte nach chronischer Behandlung mit Diazepam

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Theoretische Medizin

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Werner Adolf Nothelfer

aus Bad Dürrheim

1977

Aus dem Toxikologischen Institut der Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. H. Remmer

Über Veränderungen der Bildung von cyclischem Adenosin 3',5'- Monophosphat in Gehirnschnitten der Ratte nach chronischer Behandlung mit Diazepam

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Theoretische Medizin

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Werner Adolf Nothelfer

aus Bad Dürrheim

1977

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Prof. Dr. R. Jacob
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. J. Schultz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Remmer
Korreferent:	Prof. Dr. K. W. Bock

Meiner lieben Frau

und meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523702_0049

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
I. Einleitung	7
II. Methoden	1o
1. Vorbehandlung	1o
2. Präparation und Inkubation der Gehirnschnitte	11
3. Isolierung von cyclo-AMP	14
4. Ausbeutebestimmung und Bestimmung des cyclo-AMP-Gehaltes nach Gilman	15
5. Proteinbestimmung	16
6. Versuche mit unbehandelten Tieren	17
III. Material	19
IV. Ergebnisse	21
V. Diskussion	4o
VI. Zusammenfassung	53
VII. Literaturverzeichnis	55

I. Einleitung

Dem cyclischen Adenosin 3′, 5′- Monophosphat (cyclo-AMP) kommt durch seine Beteiligung an der Regulation sehr vieler biochemischer Prozesse im Organismus eine wesentliche Bedeutung zu. So ist es beteiligt an der Regulation der Glykogenolyse und Lipolyse (34). Ferner wurde cyclo-AMP als intrazellulärer Mediatorstoff von einer Anzahl von Hormonen in verschiedenen Geweben nachgewiesen. ACTH, Adrenalin, Glukagon und andere Peptidhormone wirken über eine Bildung von cyclo-AMP in der Zelle (34). Die Höhe der cyclo-AMP-Spiegel wird bestimmt durch die Aktivität der aufbauenden Enzyme, der Adenylatcyclasen, und der abbauenden Enzyme, der Phosphodiesterasen (PDE). Die Adenylatcyclasen katalysieren die Bildung von cyclo-AMP aus ATP, die PDE hydrolisieren cyclo-AMP zu 5′- AMP (5,59).

Butcher & Sutherland fanden 1962, daß bei Säugetieren das Gehirn im Vergleich zu anderen Organen bei weitem die höchste Aktivität an Adenylatcyclase zeigt (5). In vitro wird die cyclo-AMP-Bildung stimuliert durch biogene Amine, die auch als Neurotransmitter wirken, wie Histamin, Noradrenalin oder Serotonin (3o, 31), durch Adenosin (48), depolarisierende Substanzen (Strophantin, Veratridin) (56) und durch elektrische Stimu-

lierung (32).

Dabei ist Diazepam dreimal so wirksam als PDE-Inhibitor im Vergleich zu Chlordiazepoxid (2). Ferner beschreibt Schultz 1973 eine signifikante cyclo-AMP-Erhöhung in Gehirnrindenschnitten des Meerschweinchens bei Inkubation mit Histamin, Histamin + Noradrenalin und Adenosin in der Anwesenheit von Diazepam und seinen Metaboliten Methyloxazepam und Oxazepam (5o).

Diazepam ist ein als Tranquillizer weit verbreitetes und häufig angewandtes Psychopharmakon, das in fast alle Teilgebiete der Medizin Eingang gefunden hat. So wird es auch in der Zahnmedizin bei ängstlichen und schwer zugänglichen Patienten sowohl in der konservierenden (1,2o,21,6o) als auch in der chirurgischen Zahnheilkunde (4,19,27,43) mit Erfolg verabreicht.

In der Neurologie wird Diazepam zur Behandlung des Status epilepticus und des Petit-Mal-Status herangezogen. Hier wird neben der sedierenden vor allem die muskelrelaxierende Wirkung ausgenutzt. Während in der Zahnheilkunde die Applikationsdauer relativ kurz ist, wird bei der Epilepsiebehandlung sehr oft eine Langzeitbehandlung notwendig, die über mehrere Wochen reicht. In der Psychiatrie wird das Medikament zur Beherrschung

von Angstzuständen und Schlaflosigkeit über mehrere Monate, oft sogar Jahre verabreicht. Das Medikament wird als außerordentlich atoxisch und gut verträglich bezeichnet. Die Biochemie seiner Wirkung ist jedoch noch weitgehend unbekannt. Da es aber in vitro in Gehirnschnitten von Ratte und Meerschweinchen ein starker PDE-Inhibitor ist, besteht die Möglichkeit, daß bei länger dauernder Medikation das cyclo-AMP-System beeinflußt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie die cyclo-AMP-Bildung im Gehirn der Ratte beeinflußt wird durch die tägliche orale Gabe von Diazepam über einen Zeitraum von 21 Tagen. Ferner wurde in vitro die Wirkung von Diazepam und seinem Metabolit Desmethyldiazepam auf die cyclo-AMP-Bildung untersucht, wobei die Inkubationslösungen etwa die Wirkstoffkonzentration hatten, die im Gehirn erreicht werden dürfte.

II. Methoden

1. Vorbehandlung

Männlichen Sprague-Dawley Ratten von etwa 17o g wurde täglich einmal Diazepam in einer Dosis von 2o mg/kg Körpergewicht verabreicht. Die Applikation erfolgte morgens zwischen 8.oo h und 1o.oo h per os mittels einer Schlundsonde, die es erlaubte, die Suspension direkt in die Speiseröhre zu bringen. Als Suspension wurde eine 3,5%ige wässrige Gelatinelösung verwandt, die in 1oo ml 4oo mg Wirkstoff enthielt. Auf diese Weise war eine relativ stabile Verteilung gesichert. Bei gelegentlichem Absinken der Wirksubstanz konnte diese durch Schütteln schnell wieder suspendiert werden.

Den Kontrolltieren wurde zur selben Zeit täglich einmal auf dieselbe Art und Weise 1 ml 3,5%ige Gelatinelösung ohne Zusatz verabreicht. Dadurch waren beide Tiergruppen der gleichen, bei der Applikation unumgänglichen Streßsituation ausgesetzt. 1,3,6,1o,15 und 21 Tage nach der ersten Arzneimittelgabe wurden Experimente zur cyclo-AMP-Bildung gemacht.

2. Präparation und Inkubation der Gehirnschnitte

Ca. 24 Stunden nach der letzten Applikation wurden die Tiere durch Dekapitation getötet, die Schädeldecke sofort eröffnet und das Gehirn vorsichtig herausgenommen und in eiskalten Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer (KR-Medium) gegeben.

Für die Versuche wurden einmal der Cortex cerebri und zum zweiten das Mittelhirn mit den Basalganglien (Nukleus caudatus, Putamen, Globus pallidus, Thalamus, Hypothalamus) und Hippocampus verwendet. Die Hirnstrukturen wurden auf einer eisgekühlten Aluminiumfolie präpariert. Dabei dienten als Hilfsmittel: eine Rasierklinge und zwei kleine Pinzetten mit an den Enden abgebogenen Branchen.

Bei den Experimenten, die nur mit grauer Rindensubstanz ausgeführt wurden, wurde das Kleinhirn abgetrennt und der übrige Teil durch einen Mediansagittalschnitt halbiert. Darauf wurden von unten und medial alle Strukturen entnommen, bis nur noch der Balken (Corpus callosum) als weiße Schicht sichtbar war, der nun vorsichtig abgezogen wurde. Sollten auch das Mittelhirn und die Basalganglien verwendet werden, wurde die von Glowinski & Iversen 1966 (16) beschriebene Präparationsart gewählt. Wieder wurden Kleinhirn und

Brücke verworfen, der Rest aber durch einen frontalen Schnitt in Höhe des Chiasma opticum geteilt, nachdem der Hypothalamus zuvor entfernt worden war. Aus dem kleineren vorderen Teil wurde das Striatum herausgeschält und der Balken abgezogen. Dem größeren hinteren Teil wurde das Mittelhirn und die Basalganglien sowie der Hippocampus entnommen und der verbliebenen Rinde der Balken abgezogen. Nach den Präparationsarbeiten wurden Cortex und Mittelhirn-Basalganglien getrennt mit einem Schneideapparat (McIlwain Tissue Chopper) in 26o µm dünne Schnitte zerteilt. Die Zeit zwischen dem Töten der Tiere und dem Beginn der ersten Inkubation betrug ca. 15 - 2o min. Die Inkubationen wurden in KR-Medium bei 37° C im Wasserbad unter Carbogenbegasung (95 % O_2, 5 % CO_2) durchgeführt. Die Schnitte wurden für 1o min inkubiert, dann wurde der entstandene Schaum und der Überstand abgesaugt und einmal durch Suspendieren in warmem KR-Medium gewaschen. Anschließend wurde zu den Schnitten 16 ml frisches warmes KR-Medium gegeben, das 4 µM an Adenin war und für 4o min inkubiert. Dann wurden die Schnitte dreimal wie oben gewaschen und für weitere 1o min inkubiert. Danach folgte die Hauptinkubation, die genau 15 min dauerte. Dazu wurden die Schnitte mit einer unten sehr weiten Pipette auf kleine Bechergläser verteilt, die 9,5 ml KR-Medium und die zur Stimulie-

rung der cyclo-AMP-Bildung vorgesehenen Agentien enthielten. Das erzielte Endvolumen betrug 1o ml. Zur Stimulierung wurden in der ersten Versuchsserie, die nur mit Cortexschnitten durchgeführt wurde, Noradrenalin, Adenosin, Isoprotenol sowie zur Phosphodiesterasehemmung Diazepam allein und in Kombination mit Noradrenalin und Isoproterenol verwandt. In den folgenden Experimenten wurden für Cortexschnitte nur noch Noradrenalin und Adenosin verwendet, für Mittelhirn-Basalganglienschnitte nur Noradrenalin. Von Noradrenalin, Adenosin und Isoproterenol wurden 1o mM Stammlösungen hergestellt, von denen jeweils 1oo µl der Inkubationslösung zugegeben wurden, so daß diese o,1 mM war. Dabei wurden Isoproterenol und Noradrenalin erst kurz vor dem Beginn der Hauptinkubation zugegeben um eine Oxydation zu vermeiden. Diazepam wurde in einer Endkonzentration von o,25 mMol/l bei der Inkubation verwandt. Da es sich in KR-Medium sehr schlecht löst, wurde diese Inkubationslösung vorher hergestellt und Diazepam mit Hilfe eines Homogenisators verteilt.

Am Ende der Hauptinkubation wurden die Schnitte über einem Wasserstrahlvakuum filtriert und sofort in einem Glashomogenisator in 1 ml eiskalter 8%iger Trichloressigsäure homogenisiert. Zur Bestimmung des cyclo-AMP-Verlustes während der folgenden Isolierung wurde

der Trichloressigsäure Träger ^{14}C - cyclo - AMP
(Curie, 1o pMol) zugegeben. Mit den Kontrollschnitten wurde vor der Hauptinkubation ebenso verfahren.

3. Isolierung von cyclo-AMP

Das Homogenat der Gehirnschnitte wurde für 15 min bei 35oo Upm zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und zur Entfernung von Trichloressigsäure 4 mal mit Diäthyläther extrahiert. Der Niederschlag wurde zur Proteinbestimmung verwandt. Nach der Ätherextraktion wurde die cyclo-AMP-haltige, wässrige Phase zur Reinigung auf eine Ionenaustauschersäule (Dowex, Type 5o x 8, 1oo - 2oo mesh, Säulenmaße 5 x 7o mm) gegeben und mit ca. 15 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurde mit ca. 5 ml o,1 N HCl eluiert. Das Eluat wurde lyophilisiert und je nach Höhe des zu erwartenden cyclo-AMP-Gehaltes in o,5 oder 1 ml Acetatpuffer (o,o5 M, pH 4) gelöst. Während der Durchführung der Versuchsreihen wurde von Schultz ein vereinfachtes Verfahren entwickelt, das die Ätherextraktion überflüssig macht. Dazu wurden die Gehirnschnitte statt in Trichloressigsäure in o,4 N Perchlorsäure homogenisiert. Nach dem Zentrifugieren wurde dann der Überstand wieder abpipettiert und nun mit 1oo µl einer zuvor eingestellten Trislösung (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) neutralisiert und auf die Ionenaustauschersäulen (jetzt

Dowex, Type 1 x 8, 2oo - 4oo mesh) gegeben.

4. Ausbeutebestimmung und Bestimmung des cyclo-AMP-Gehaltes nach Gilman

Da durch die Isolierung ein bestimmter Prozentsatz des zu bestimmenden cyclo-AMP verloren geht, muß die Ausbeute des im Acetatpuffer gelösten cyclo-AMP bestimmt werden. Dazu entnimmt man ein Aliquot der Lösung und bestimmt im Flüssigkeits-Szintillationszähler den Gehalt an ^{14}C-cyclo-AMP. Dabei wurden beim grobkörnigen Ionenaustauscher (1oo - 2oo mesh) 4o % - 7o % des zugesetzten Träger ^{14}C-cyclo-AMP wiedererhalten, beim feinkörnigen (2oo - 4oo mesh) 6o % - 95 %. Der andere Teil der Lösung wurde zur Bestimmung des unmarkierten cyclo-AMP nach Gilman (15) verwendet. Die Bestimmung des cyclo-AMP erfolgte durch Herrn Schultz und Fräulein Kleefeld. Die Bestimmungsmethode beruht auf der Tatsache, daß eine bestimmte Menge einer cyclo-AMP-abhängigen Proteinkinase bei der Sättigungskonzentration von cyclo-AMP immer die gleiche Menge cyclo-AMP bindet. Der entstandene cyclo-AMP-Enzymkomplex kann durch Filtration von ungebundenem cyclo-AMP getrennt werden. Geht man von einer bestimmten Menge radioaktiv markierten cyclo-

AMPs aus, so findet bei Zusatz von unmarkiertem cyclo-AMP eine Isotopenverdünnung statt und es wird entsprechend weniger radioaktives cyclo-AMP an die Proteinkinase gebunden. Die Menge an gebundenem radioaktiven cyclo-AMP wird im Flüssigkeits-Szintillationszähler bestimmt. Anhand einer Eichkurve, die für jeden Test neu aufgenommen wird, kann so der cyclo-AMP-Gehalt von Versuchsproben bestimmt werden.

5. Proteinbestimmung

Der beim Zentrifugieren erhaltene Niederschlag wurde zur Proteinbestimmung verwendet. Sie wurde nach der modifizierten Biuret-Methode (3,28) durchgeführt. Dem Niederschlag wurde 1 ml Na-Desoxycholatlösung (5 %) zugegeben und anschließend in Einmalreagenzgläser eingewogen. Von den so erhaltenen Lösungen wurden 2 Proben zu o,3 und o,6 ml entnommen, auf 2,5 ml mit Wasser aufgefüllt und mit 2,5 ml Biuretlösung versehen. Die Extinktion dieser Proben wurde nach 3o min in einem Zeiss-Spektralphotometer bei 546 nm gegen eine Kontrolle aus 2,5 ml Wasser und 2,5 ml Biuretlösung gemessen. Aus der gemessenen Extinktion und der Einwaage läßt sich nun der Proteingehalt errechnen:

$$\frac{E_{0,3} + E_{0,6}}{0,9} \times 16,5 \times m\,(g) = p\,(mg)$$

wobei $E_{0,3}$ = gemessene Extinktion der Probe zu 0,3 ml

$E_{0,6}$ = gemessene Extinktion der Probe zu 0,6 ml

16,5 = Laborkonstante

m (g) = Einwaage in g

p (mg) = Proteingehalt in mg

6. Versuche mit unbehandelten Tieren

Für die Versuche mit unbehandelten Ratten wurden für eine Inkubation die Gehirne von 3 Tieren benutzt. Dabei wurde nur graue Rindensubstanz verwendet. Die Präparation und Inkubation der Gehirnmitte wurde durchgeführt wie oben beschrieben. Die Hauptinkubation wurde mit folgenden Lösungen durchgeführt:

Noradrenalin und Adenosin je allein,

Noradrenalin und Adenosin je mit Diazepam (Konzentration 3 µg/ml),

Noradrenalin und Adenosin je mit Desmethyldiazepam (Konzentration 3 µg/ml).

Die Isolierung von cyclo-AMP, die Ausbeutebestimmung, die Proteinbestimmung und die Bestimmung des cyclo-AMP-Gehaltes nach Gilman wurden durchgeführt wie oben beschrieben.

Um eine statistische Aussage machen zu können, wurden alle Experimente unter gleichen Bedingungen 3 bis 11 mal durchgeführt.
Statistische Vergleiche der Ergebnisse wurden mit einem Student t-Test vorgenommen.

III. Material

Männliche Sprague-Dawley Ratten waren von der Firma Ivanovas, Kißlegg/Allgäu.

Diazepam wurde freundlicherweise von der Firma Hoffmann-La Roche, Grenzach/Baden zur Verfügung gestellt.

^{3}H-cyclo-AMP, 37 C/mMol	von Amersham-Buchler (Braunschweig)
^{14}C-cyclo-AMP, 5o m C/mMol	von New England Nuclear (Boston, USA)
Adenosin, Noradrenalin und Isoproterenol	von Calbiochem, (San Diego, USA)
Dowex-Ionenaustauscher, Type 5o x 8, 1oo x 2oo mesh, und Type 1 x 8, 2oo - 4oo mesh	von Serva (Heidelberg)

Alle anderen Substanzen waren von Merck, Darmstadt.

Lösungen:

a) Krebs-Ringer-Medium:

122	mMol	NaCl
1o	mMol	D-Glucose
25	mMol	$NaHCO_3$
3	mMol	KCl
1,2	mMol	$MgSO_4$
o,4	mMol	K_2HPO_4
1,3	mMol	$CaCl_2$
1ooo	ml	Aqua dest.

b) Biuret-Lösung:

3o	mMol	$CuSO_4$
58	mMol	K-Na-Tartrat
3o	mMol	KJ
2oo	ml	1 N NaOH
8oo	ml	Aqua dest.

IV. Ergebnisse

Die Ratten wurden, wie unter II.1 beschrieben, bis zu 3 Wochen vorbehandelt. Die Gewichtszunahme betrug in dieser Zeit etwa 5 g pro Tag. Zwischen den mit Diazepam und den mit Placebo behandelten Ratten konnte keine signifikante Änderung der Gewichtszunahme festgestellt werden (Tab. 1, Abb. 1).

Bei den Kontrolltieren ist der cyclo-AMP-Basalspiegel ohne Aktivierung des Adenylatcyclase-Systems über die gesamte Versuchsdauer von 3 Wochen sowohl im Rinden- wie auch im Mittelhirn-Basalganglienbereich nur geringen Schwankungen unterworfen und beträgt im Mittel 14,7 bzw. 5,4 pMol/mg Protein (Tab. 2, Abb. 2,5).

Wird die cyclo-AMP-Bildung mit Noradrenalin oder Adenosin stimuliert, so tritt bei Gewebeschnitten des Cortex cerebri am Tag 1o, bei Gewebeschnitten des Mittelhirns und der Basalganglien am Tag 15 eine scheinbar erniedrigte Aktivität des Adenylatcyclase-Systems auf. Deshalb wurden in Ergänzung zu den Tageskontrollwerten auch die Gesamtkontrollwerte für die entsprechenden Inkubationen errechnet und am Ende der Tabellen aufgeführt (Tab. 3,4 und Abb. 3,4,6).

Bei den mit Diazepam vorbehandelten Tieren konnte bei den Kontrollinkubationen des Cortex cerebri am Tag 3 eine signifikante Erhöhung des cyclo-AMP-Basalspiegels um 34,6 % gegen den entsprechenden Wert der mit Placebo behandelten Ratten festgestellt werden. Am Tag 1 war eine Erhöhung um 23,8 % festzustellen, die jedoch nicht signifikant war. An allen anderen Tagen waren keine Veränderungen zu beobachten (Tab. 2, Abb. 2).

Wurde die cyclo-AMP-Bildung mit Noradrenalin stimuliert, so konnte bei Gewebeschnitten weder des Cortex noch des Mittelhirns und der Basalganglien eine signifikante Änderung der cyclo-AMP-Bildung im Vergleich zu entsprechenden Versuchen mit Kontrolltieren nachgewiesen werden (Tab. 3, Abb. 3,6).

Erfolgte die Aktivierung des Adenylatcyclase-Systems jedoch mit Adenosin, so gab es eine signifikante Erhöhung der cyclo-AMP-Bildung um 39,3 % bei Cortexgewebeschnitten am Tag 3 nach Beginn der Applikation von Diazepam. Am Tag 6 und 1o ist ebenfalls noch eine erhöhte cyclo-AMP-Bildung im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen der selben Tage zu beobachten, sie ist jedoch nicht mehr signifikant (Tab. 4, Abb. 4).

In der ersten Versuchsserie wurden Cortexschnitte mit Noradrenalin, Noradrenalin + Diazepam (o,25 mM), Isoproterenol, Isoproterenol + Diazepam (o,25 mM) und mit Diazepam (o,25 mM) allein inkubiert. Dabei erhielt man bei den Inkubationen von Cortexschnitten unbehandelter Ratten, die Diazepam enthielten und im Vergleich zu entsprechenden Kontrollinkubationen immer einen höheren cyclo-AMP-Spiegel. Durch hohe Standardabweichung war jedoch nur die cyclo-AMP-Anhäufung bei Inkubation mit Isoproterenol + Diazepam gegenüber Isoproterenol signifikant erhöht. Bei Inkubationen von Gewebeschnitten des Cortex cerebri von Ratten, die mit Diazepam vorbehandelt wurden, konnte ebenfalls immer ein erhöhter cyclo-AMP-Spiegel erhalten werden, wenn Diazepam noch zusätzlich in der Inkubationslösung enthalten war. Dabei wurden die Werte aller Versuchstage zusammengenommen. Hier wurde eine etwas stärkere Erhöhung der cyclo-AMP-Spiegel erhalten als bei unvorbehandelten Ratten, jedoch erscheint infolge der hohen Standardabweichungen keine Position signifikant (Tab. 5,6, Abb. 7). Bei einer abschließenden Versuchsreihe mit nicht vorbehandelten Tieren wurden Cortexgewebeschnitte mit Noradrenalin und Adenosin in Anwesenheit von Diazepam und seinem Metabolit Desmethyldiazepam inkubiert, die in etwa der Konzentration zugegeben wurden, wie sie bei Anwendung am lebenden Tier erreicht wer-

den dürfte (14). Dabei zeigte die Inkubation mit Noradrenalin + Diazepam eine signifikante Erhöhung der cyclo-AMP-Anhäufung um 59,3 % gegenüber der Inkubation mit Noradrenalin. Bei Inkubation mit Noradrenalin + Desmethyldiazepam war ebenfalls eine Erhöhung des cyclo-AMP-Spiegels um 4o,4 % festzustellen, die jedoch nicht signifikant erscheint (Tab. 7, Abb. 8).

Wurde mit Adenosin, Adenosin + Diazepam und Adenosin + Desmethyldiazepam inkubiert, zeigten sich keine signifikanten Änderungen (Tab. 7, Abb. 8).

Tabelle 1: Einfluß der Behandlung mit Diazepam auf Die Gewichtszunahme der Ratten. Angegeben sind die Gewichte in g mit ihrem Standardfehler. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Tiere an.

Dauer der Vorbehandlung in Tagen	Vorbehandlung mit Placebo	Vorbehandlung mit Diazepam 2o mg/kg
1	174 ± 1 (76)	182 ± 2 (56)
5	195 ± 2 (47)	2o3 ± 2 (4o)
1o	224 ± 3 (34)	229 ± 3 (31)
15	249 ± 3 (25)	251 ± 5 (18)
21	273 ± 4 (14)	255 ± 7 (6)

Tabelle 2: Einfluß der Behandlung mit Diazepam auf die cyclo-AMP-Basalspiegel (pmol/mg Protein) in Gewebeschnitten des Cortex cerebri sowie des Mittelhirns und der Basalganglien der Ratte. Die Ergebnisse sind angegeben mit ihrem Standardfehler. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der getrennt durchgeführten Experimente an.

Gehirn-strukturen	Vorbehandlung mit	Tag 1	Tag 3	Tag 6	Tag 1o	Tag 15	Tag 21	Gesamtkon-trollwert
Cortex cerebri	Placebo	17 ± 3 (1o)	14 ± 2 (12)	14 ± 2 (12)	15 ± 2 (12)	14 ± 2 (9)	15 ± 2 (12)	15 ± 1 (67)
	Diazepam	18 ± 3 (5)	2o ± 2 (9)^{x}	15 ± 1 (6)	14 ± 1 (11)	16 ± 2 (6)	16 ± 3 (6)	
Mittelhirn-Basalganglien	Placebo	6 ± 1 (4)	8 ± 2 (4)	4 ± o (4)	4 ± 1 (4)	5 ± 2 (2)	6 ± 1 (4)	5 ± 1 (22)
	Diazepam	6 ± 1 (4)	5 ± 2 (3)	4 ± o (4)	4 ± o (4)	4 ± 2 (2)	3 ± 1 (4)	

^{x} : $p < o,o5$

Tabelle 3: Einfluß der Vorbehandlung mit Diazepam auf die cyclo-AMP-Bildung (pmol/mg Protein) durch Stimulierung des Adnylatcyclasesystems mit Noradrenalin in Gewebeschnitten des Cortex cerebri sowie des Mittelhirns und der Basalganglien der Ratte. Die Ergebnisse sind angegeben mit ihrem Standardfehler. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der getrennt durchgeführten Experimente an.

Gehirnstrukturen	Vorbehandlung mit	Tag 1	Tag 3	Tag 6	Tag 1o	Tag 15	Tag 21	Gesamtkontrollwert
Cortex cerebri	Placebo	6o ± 18 (5)	44 ± 7 (6)	55 ± 6 (6)	38 ± 8 (6)	47 ± 16 (3)	59 ± 11 (6)	51 ± 4 (67)
	Diazepam	54 ± 3 (5)	63 ± 21 (1o)	58 ± 9 (7)	44 ± 3 (11)	6o ± 9 (6)	44 ± 7 (8)	
Mittelhirn-Basalganglien	Placebo	19 ± 6 (3)	2o ± 3 (4)	14 ± 1 (4)	14 ± 5 (4)	1o ± 1 (2)	18 ± 3 (4)	16 ± 1 (21)
	Diazepam	23 ± 5 (4)	21 ± 3 (4)	18 ± 5 (4)	16 ± 4 (4)	12 ± 2 (2)	18 ± 4 (4)	

Tabelle 4: Einfluß der Vorbehandlung mit Diazepam auf die cyclo-AMP-Bildung (pmol/mg Protein) durch Stimulierung des Adenylatcyclasesystems mit Adenosin in Gewebeschnitten des Cortex cerebri der Ratte. Die Ergebnisse sind angegeben mit ihrem Standardfehler. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der getrennt durchgeführten Experimente an.

Vorbehandlung mit	Tag 1	Tag 3	Tag 6	Tag 1o	Tag 15	Tag 21	Gesamtkontrollwert
Placebo	66 ± 15 (5)	61 ± 6 (6)	62 ± 9 (6)	5o ± 11 (6)	74 ± 39 (3)	68 ± 14 (6)	62 ± 5 (32)
Diazepam	65 ± 13 (5)	87 ± 8 (1o)^{x}	77 ± 15 (7)	62 ± 6 (11)	71 ± 11 (6)	75 ± 12 (8)	

^{x} : $p < o,o5$

Tabelle 5: Einfluß von Diazepam (o,25 mM) in vitro auf die cyclo-AMP-Spiegel (pMol/mg Protein) in Gewebeschnitten des Cortex cerebri von Ratten, die mit Placebo vorbehandelt waren. Die Ergebnisse sind angegeben mit ihrem Standardfehler. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der getrennt durchgeführten Experimente an.

	Stimulierung der cyclo-AMP-Bildung durch		
	Nichts	Noradrenalin	Isoproterenol
Kontrolle	25,6 ± 4,2 (5)	77,2 ± 16,8 (5)	4o,6 ± 7 (5)
Diazepam (o,25 mM)	34,4 ± 6,2 (5)	136,8 ± 37,4 (5)	91,8 ± 2o,9 (5)^{x}
Erhöhung in %	34,4 %	77,2 %	126,1 %

^{x}: $p < o,o5$

Tabelle 6: Einfluß von Diazepam (o,25 mM) in vitro auf die cyclo-AMP-Spiegel (pMol/mg Protein) in Gewebeschnitten des Cortex cerebri von Ratten, die mit Diazepam vorbehandelt waren. Die Ergebnisse sind angegeben mit ihrem Standardfehler. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der getrennt durchgeführten Experimente an.

	Stimulierung der cyclo-AMP-Bildung durch		
	Nichts	Noradrenalin	Isoproterenol
Kontrolle	24,7 ± 4,9 (6)	1o2 ± 18,2 (6)	54,6 ± 1o,9 (5)
Diazepam (o,25 mM)	34,8 ± 6,2 (6)	184 ± 34,5 (6)	14o,2 ± 43,2 (5)
Erhöhung in %	4o,9 %	8o,4 %	138,7 %

Tabelle 7: Erhöhung der cyclo-AMP-Bildung (pmol/mg Protein) bei Inkubation von Gewebeschnitten des Cortex cerebri von nicht vorbehandelten Ratten mit Diazepam und Desmethyldiazepam (je 3 µg/ml) in Anwesenheit von Noradrenalin und Adenosin. Von den erhaltenen Werten wurde der jeweilige Kontrollwert subtrahiert, so daß die effektive Erhöhung von cyclo-AMP über dem Basalspiegel angegeben ist. Die Ergebnisse sind angegeben mit ihrem Standardfehler. In Klammern die Anzahl der verschiedenen Versuche.

Zusatz	Noradrenalin	Erhöhung	Adenosin	Erhöhung
-	29,7 ± 2 (3)	-	4o,3 ± 2,3 (3)	-
Diazepam 3 µg/ml	47,3 ± 6,2 (3)^{x}	59,3 %	49,3 ± 7,3 (3)	22,3 %
Desmethyl-Diazepam 3 µg/ml	41,7 ± 1o,9 (3)	4o,4 %	41,o ± 11,6 (3)	1,7 %

^{x}: $p \leq o,o5$

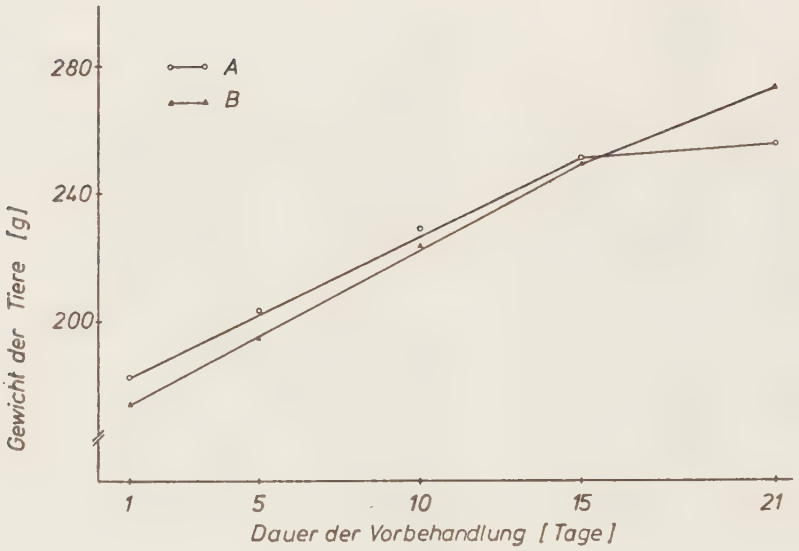

Abb. 1: Gewichtszunahme der mit Diazepam (A) und der mit Placebo (B) vorbehandelten Ratten.

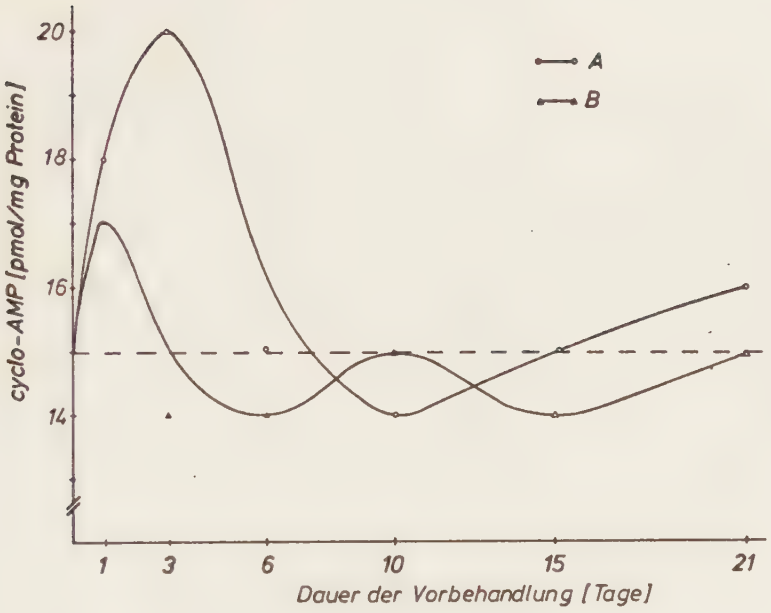

Abb. 2: cyclo-AMP-Basalspiegel in Gewebeschnitten des Cortex cerebri nach Vorbehandlung der Tiere mit Diazepam (A) und Placebo (B). Die gestrichelte Linie gibt den Gesamtkontrollwert an, der als arithmetisches Mittel der Tageskontrollwerte (Behandlung mit Placebo) errechnet wurde.

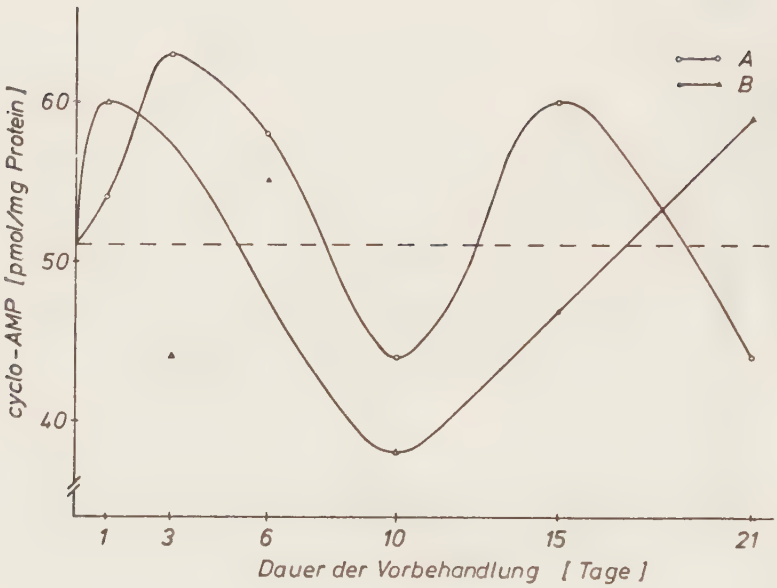

Abb. 3: cyclo-AMP-Spiegel in Gewebeschnitten des Cortex cerebri nach Stimulierung des Adenylatcyclase-systems mit Noradrenalin (o,1 m M). Vorbehandlung der Tiere mit Diazepam (A) und Placebo (B). Die gestrichelte Linie gibt den Gesamtkontrollwert an, der als arithmetisches Mittel der Tageskontrollwerte (Behandlung mit Placebo) errechnet wurde.

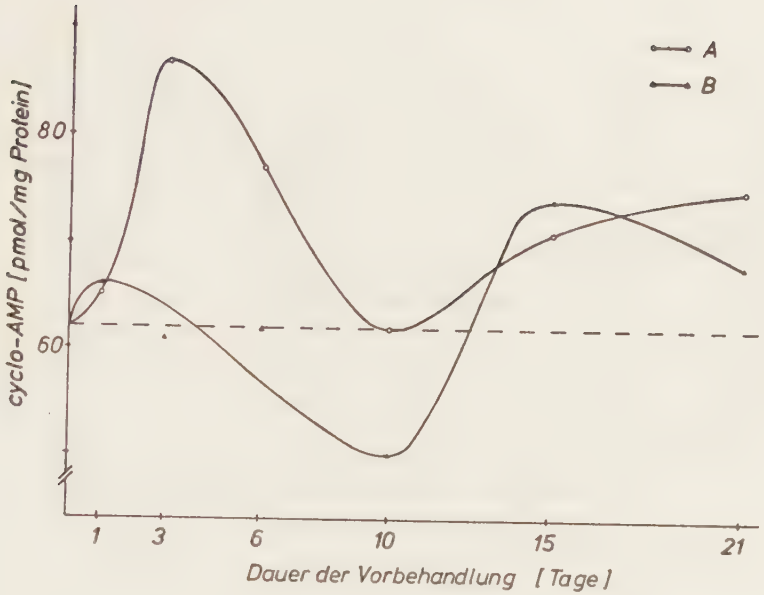

Abb. 4: cyclo-AMP-Spiegel in Gewebeschnitten des Cortex cerebri nach Stimulierung des Adenylatcyclasesystems mit Adenosin (o,1 mM). Vorbehandlung der Tiere mit Diazepam (A) und Placebo (B). Die gestrichelte Linie gibt den Gesamtkontrollwert an, der als arithmetisches Mittel der Tageskontrollwerte (Behandlung mit Placebo) errechnet wurde.

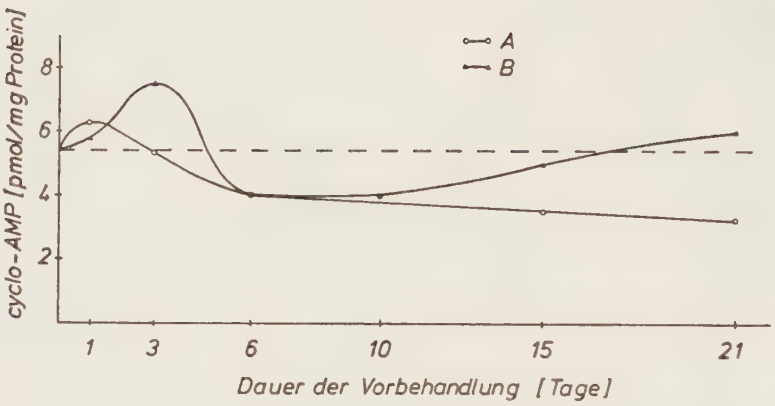

Abb. 5: cyclo-AMP-Basalspiegel in Gewebeschnitten des Mittelhirns und der Basalganglien nach Behandlung der Tiere mit Diazepam (A) und Placebo (B). Die gestrichelte Linie gibt den Gesamtkontrollwert an, der als arithmetisches Mittel der Tageskontrollwerte (Behandlung mit Placebo) errechnet wurde.

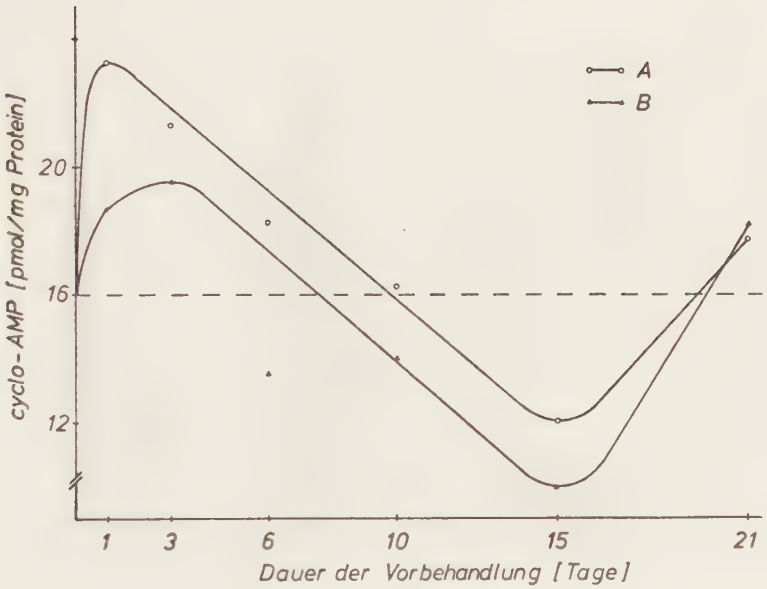

Abb. 6: cyclo-AMP-Spiegel in Gewebeschnitten des Mittelhirns und der Basalganglien nach Stimulierung des Adenylatcyclasesystems mit Noradrenalin (o,1 mM). Vorbehandlung der Tiere mit Diazepam (A) und Placebo (B). Die gestrichelte Linie gibt den Gesamtkontrollwert an, der als arithmetisches Mittel der Tageskontrollwerte (Behandlung mit Placebo) errechnet wurde.

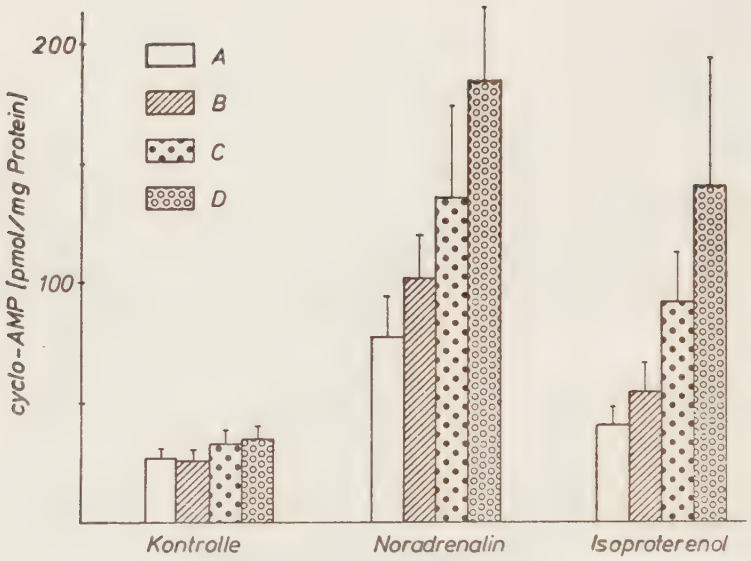

Abb. 7: Einfluß von Diazepam (o,25 mM) in vitro auf die cyclo-AMP-Bildung in Gewebeschnitten des Cortex cerebri. Das Adenylatcyclasesystem wurde stimuliert mit Noradrenalin, Isoproterenol und nichts (Kontrolle).

A = Gewebeschnitte vom Cortex cerebri, Ratten mit Placebo vorbehandelt, Inkubation ohne Diazepam.

B = Gewebeschnitte vom Cortex cerebri, Ratten mit Diazepam vorbehandelt, Inkubation ohne Diazepam.

C = Gewebeschnitte vom Cortex cerebri, Ratten mit Placebo vorbehandelt, Inkubation mit Diazepam.

D = Gewebeschnitte vom Cortex cerebri, Ratten mit Diazepam vorbehandelt, Inkubation mit Diazepam.

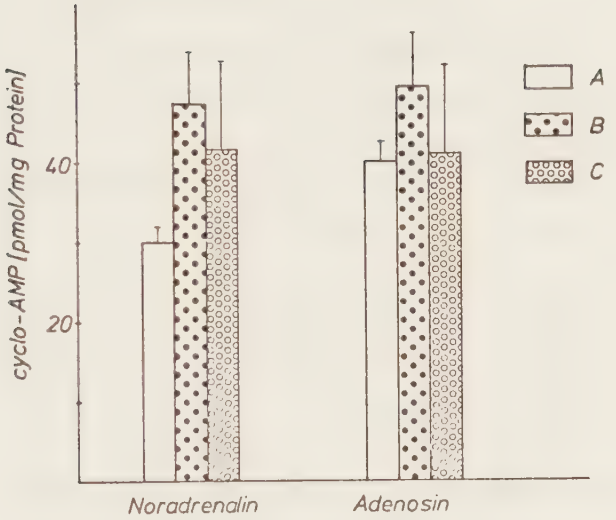

Abb. 8: Erhöhung der cyclo-AMP-Bildung in Gewebeschnitten des Cortex cerebri von nicht vorbehandelten Ratten bei Inkubation mit Diazepam und Desmethyldiazepam (je 3 µg/ml) in Anwesenheit von Noradrenalin und Adenosin.

A = ohne Zusatz

B = mit Diazepam

C = mit Desmethyldiazepam

V. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde Ratten über einen längeren Zeitraum Diazepam verabreicht, wie dies bei der Therapie am Menschen häufig vorkommt. Die orale Applikation wurde deswegen gewählt, weil tägliche intraperitoneale Injektionen über Wochen Infektionen und Nekrosen des Peritoneums verursachen können. Die Entwicklung der mit Diazepam behandelten Tiere war, verglichen mit den Kontrolltieren, nur unwesentlich beeinträchtigt, so daß es scheint, daß der Wirkstoff keine Schädigungen verursacht.

Die hier verwendeten Gehirnstrukturen wurden deshalb gewählt, weil Skolnick & Daly gefunden haben, daß in diesen Gebieten die von Noradrenalin hervorgerufene cyclo-AMP-Erhöhung bei verschiedenen Rattenstämmen in Wechselbeziehung steht zu der entsprechenden spontanen motorischen Aktivität (58). Die unterschiedliche Anhäufung von cyclo-AMP in Beziehung zur spontanen motorischen Aktivität ist auffallend, sie ist jedoch nicht einheitlich in den untersuchten Hirnarealen. Erhöhte motorische Aktivität ist verknüpft mit einer gesteigerten noradrenalinabhängigen cyclo-AMP-Bildung im Mittelhirn und den Basalganglien, während im Cortex cerebri die noradrenalininduzierte cyclo-AMP-Bildung eingeschränkt ist (58).

Die Wirkung von Diazepam beruht unter anderem auf der Herabsetzung des durch emotionellen Streß erhöhten Aktivitätsniveaus jener Hirnbezirke (limbisches System, Hypothalamus), in denen emotionelle Reize verarbeitet werden ("Valium Roche", Merkblatt von Hofmann-La Roche, 1974).

Bei der Ratte ist fast der gesamte Cortex cerebri dem limbischen System zuzuordnen (13,38). Die Regionen des Mittelhirns und der Basalganglien sind als Durchgangs- und Umschaltstationen der Bahnen des extrapyramidal-motorischen Systems charakterisiert worden, das die unwillkürlichen motorischen Reize leitet (35). Betrachtet man die spontane motorische Aktivität als Antwort auf emotionelle Reize, ist eine Veränderung der noradrenalinabhängigen cyclo-AMP-Bildung in beiden Gewebepräparationen möglicherweise zu erwarten.

Man hat festgestellt, daß Diazepam auch die Menge und den Stoffwechsel von biogenen Aminen, die für Neurotransmitter gehalten werden, im ZNS beeinflußt (8,11, 12,29,37,49). Fennessy und Lee finden im Mäusegehirn erhöhte Noradrenalinspiegel bei Diazepambehandlung (12), während Lidbrink et al. von einer verminderten Freisetzung von Noradrenalin, Dopamin und 5-Hydroxytryptamin speziell im Cortex cerebri der Ratte be-

richten (37). Corrodi brachte 1971 die Verminderung der nervösen Aktivität in Noradrenalin- und Dopaminneuronen bei Diazepambehandlung in Verbindung mit seiner Wirkungsweise (8).

Biogene Amine haben aber auch teil an der Regulation von cyclo-AMP-Spiegeln im Gehirn. Es wurde gezeigt, daß eine Beeinflussung des Katecholaminstoffwechsels durch Pharmaka zu Veränderungen der Empfindlichkeit des Adenylatcyclasesystems im Gehirn führen kann (1o, 26,33). Werden Ratten mit 6-Hydroxydopamin vorbehandelt, so beobachtet man eine Verminderung des Katecholamingehaltes adrenerger Neuronen und eine anschließende erhöhte Empfindlichkeit des cyclo-AMP-bildenden Systems gegenüber Noradrenalin (26,33).

Diese Ergebnisse ließen eine wenigstens bescheidene Erhöhung der Noradrenalinempfindlichkeit des Adenylatcyclasesystems erwarten.

Ein solcher Effekt konnte jedoch weder im Cortex cerebri noch im Bereich des Mittelhirns und der Basalganglien gefunden werden. Zwar zeigte sich in letzterem am Tag 1 eine Erhöhung des cyclo-AMP-Spiegels um 43,75 % gegenüber dem entsprechenden Gesamtkontrollwert, doch war diese Erhöhung nicht signifikant.

Sie würde übereinstimmen mit den Beobachtungen an den Tieren und den Ergebnissen von Skolnick und Daly (58), wonach eine Erhöhung der noradrenalinabhängigen cyclo-AMP-Bildung in diesem Hirnbereich mit einer verstärkten spontanen motorischen Aktivität verbunden ist, die in der Tat während der ersten beiden Behandlungstage festzustellen war.

Wurde die cyclo-AMP-Bildung aber mit Adenosin stimuliert, wurde eine statistisch signifikante Erhöhung der cyclo-AMP-Bildung um 39,3 % am Tag 3 bei Cortexgewebeschnitten gefunden. Ab dem 6. Tag nach Beginn der Behandlung ist die cyclo-AMP-Bildung zwar noch erhöht, aber nicht mehr signifikant. Das Schaubild weist den tiefsten Punkt am Tag 1o auf, um dann wieder etwas anzusteigen.

Vergleicht man den zeitlichen Verlauf des cyclo-AMP-Basalspiegels von Ratten, die mit Diazepam vorbehandelt wurden mit dem Diagramm für Ratten, die Placebo erhielten, so stellt man am Tag 3 eine signifikante Erhöhung des cyclo-AMP-Basalspiegels um 34,6 % fest bei Ratten, die mit Diazepam vorbehandelt wurden. Sodann fällt der cyclo-AMP-Spiegel wieder ab bis zum tiefsten Punkt am Tag 1o, um dann wieder leicht anzusteigen.

Die Erhöhung tritt zu dem selben Zeitpunkt ein wie der Anstieg der cyclo-AMP-Bildung bei Stimulierung des Adenylatcyclasesystems mit Adenosin. Die erhöhte Anhäufung erfolgt also von einem erhöhten Basalspiegel aus.

Diazepam wirkt in vitro als Phosphodiesterase-Inhibitor (5o). Zwischen der letzten Applikation und der Durchführung der Experimente lagen jedoch 24 Stunden. Es gibt Untersuchungen über die Höhe von Blut- und Gehirnspiegeln von Diazepam und seinen Metaboliten in Mäusen, Meerschweinchen und Ratten nach einer einmaligen i.v. Dosis von 5 mg/kg Diazepam. Dabei wurde gefunden, daß der Blutspiegel von Diazepam in Ratten schneller abfällt als in Mäusen und Meerschweinchen und daß Desmethyldiazepam nur 5 min nach der Applikation im Blut nachgewiesen werden kann, Oxazepam überhaupt nicht. 1o Stunden nach der Applikation konnte im Blut der Ratten kein Diazepam mehr nachgewiesen werden. Auch im Gehirn ging der Abbau von Diazepam in der Ratte schneller vonstatten als in Mäusen und Meerschweinchen. So konnte in Rattengehirnen 2o Stunden nach der Applikation kein Diazepam mehr nachgewiesen werden, während in Meerschweinchengehirnen 1o ng/g und in Mäusegehirnen weniger als 1o ng/g ge-

funden wurden. Das Verhältnis Gehirnspiegel zu Blutspiegel steigt bei Ratten kontinuierlich an; auch bei Meerschweinchen und Mäusen ist es zu jedem Zeitpunkt der Untersuchung größer als 1. Das bedeutet, daß im Gehirn eine Anreicherung von Diazepam stattfindet (14).

Bei Untersuchungen am Menschen wurde gefunden, daß sowohl Diazepam wie auch Desmethyldiazepam bei oraler Anwendung über mehrere Tage im Serum angereichert werden. Ein gleichmäßiger Serumspiegel wird dabei von Diazepam am Ende der ersten Woche erreicht, von Desmethyldiazepam am Anfang der zweiten Woche und von diesem Zeitpunkt an ist er höher als der der Muttersubstanz. Als biologische Halbwertszeit wurde für Diazepam 54 Stunden gefunden, für Desmethyldiazepam 92 Stunden (22).

Aufgrund der dreifach höheren Dosierung der hier verwendeten Tiere gegenüber denen der oben erwähnten Untersuchung und den am Menschen gefundenen Ergebnissen wird spekuliert, daß während der Dauer der hier beschriebenen Versuche eine Anreicherung von Diazepam im Gehirn der Ratten stattfindet. Dadurch wäre auch die Erhöhung des cyclo-AMP-Basalspiegels am Tag 3 zu erklären, die über eine Hemmung der Phosphodiesterase-

aktivität vor sich gehen kann. Diese dürfte allerdings nicht direkt, sondern indirekt über einen noch unbekannten Reaktionsmechanismus hervorgerufen sein. Gegen die direkte Aktion von Diazepam als Phosphodiesterase-Inhibitor spricht das Fehlen einer signifikanten Erhöhung der noradrenalinstimulierten cyclo-AMP-Bildung. Es ist zwar auch bei Noradrenalin eine leicht erhöhte cyclo-AMP-Bildung am Tag 3 festzustellen, doch erfolgt diese von einem erhöhten Basalspiegel aus und ist wahrscheinlich hiermit zu erklären.

Adenosin ist ein sehr wirkungsvolles Agens zur Stimulierung der cyclo-AMP-Bildung, seine Rolle im Gehirn, speziell in Beziehung zum Adenylatcyclasesystem, ist noch unklar. Vor kurzem wurde berichtet, daß Adenosin die Amplitude des postsynaptischen Potentials beträchtlich erniedrigt und gleichzeitig die cyclo-AMP-Bildung erhöht (36,42). Deshalb könnte man vermuten, daß Adenosin eine Art Neuromodulatorstoff darstellt, der auf das Adenylatcyclasesystem wirkt und die pharmakologischen Wirkungen von Diazepam wie Sedierung und EEG-Dämpfung damit zusammenhängen, daß also die gesteigerte adenosininduzierte cyclo-AMP-Bildung wie auch der erhöhte cyclo-AMP-Basalspiegel nicht direkt durch die Wirkung von Diazepam als Phosphodiesterase-Inhibitor

hervorgerufen wird.

Schon 1972 äußerten Huang & Daly den Verdacht, daß die von ihnen gefundene cyclo-AMP-Erhöhung bei Inkubation von Schnitten des Cortex cerebri mit verschiedenen Antidepressiva und Tranquillizern in vitro über eine Freisetzung von Adenosin zustande kommt (25).

Dieser Hypothese widersprechen auch nicht die Ergebnisse der eigenen in vitro-Experimente, bei denen Schnitte des Cortex cerebri mit Noradrenalin und Adenosin in Anwesenheit von Diazepam und Desmethyldiazepam in Konzentrationen, wie sie im Gehirn erreicht werden (14), inkubiert wurden. Hier wurde gefunden, daß bei Stimulierung mit Noradrenalin + Diazepam eine signifikante Erhöhung um 39 % der cyclo-AMP-Bildung im Vergleich zur Stimulierung mit Noradrenalin allein zu beobachten ist, bei Stimulierung mit Adenosin + Diazepam die cyclo-AMP-Bildung im Vergleich zum entsprechenden Kontrollwert zwar noch um 22,3 % erhöht ist, aber nicht mehr signifikant (Abb. 7, Tab. 7).

Dies deutet darauf hin, daß Noradrenalin an der Sofortwirkung beteiligt sein könnte, Adenosin mehr an der Langzeitwirkung, wie sie hier untersucht wurde.

Deshalb sind 24 Stunden nach der letzten Applikation die noradrenalininduzierten cyclo-AMP-Spiegel an keinem Versuchstag signifikant erhöht, wohl aber die adenosinabhängigen, während bei Inkubation mit dem Medikament in vitro die cyclo-AMP-Erhöhung durch Adenosin nicht signifikant ist, aber die durch Stimulierung mit Noradrenalin.

Wie läßt sich nun aber der Abfall der erhöhten cyclo-AMP-Basalspiegel und adenosinabhängigen cyclo-AMP-Bildung zwischen Tag 3 und 1o erklären?

Bei Untersuchungen an Meerschweinchen wurde gefunden, daß eine Erhöhung von cyclo-AMP-Spiegeln in Gehirnrindenschnitten durch Stimulierung mit Histamin, Histamin + Noradrenalin oder Adenosin wahrscheinlich über eine Erhöhung von intrazellulären Ca^{2+}-Ionenspiegeln eine verstärkte Phosphodiesteraseaktivität zufolge hat, die sehr schnell in Erscheinung tritt (51). Es wäre denkbar, daß generell, also auch durch Diazepam, erhöhte cyclo-AMP-Spiegel zu einer solchen Selbstregulation fähig sind. Daß die verstärkte Phosphodiesteraseaktivität erst nach dem 3. Tag sichtbar wird, könnte man damit erklären, daß bis zu diesem Zeitpunkt die Diazepamkonzentration in der Zelle zunimmt und die inhibitorische Wirkung von Diazepam

die aktivierende Wirkung eines erhöhten cyclo-AMP-Spiegels auf die Phosphodiesterase überwiegt. Hat der Diazepam-Spiegel im Gehirn seinen höchsten Wert erreicht, was nach den vorliegenden Ergebnissen bei der Ratte nach dem dritten Tag der Fall sein dürfte, überwiegt die durch die erhöhten cyclo-AMP-Spiegel hervorgerufene verstärkte Phosphodiesteraseaktivität, die ein Absinken des cyclo-AMP-Spiegels zur Folge hat. Dieser Mechanismus ist für den zeitlichen Verlauf sowohl der cyclo-AMP-Spiegel als auch der adenosinabhängigen cyclo-AMP-Bildung vorstellbar. Bei der täglichen Behandlung von Ratten mit Diazepam liegt dem zeitlichen Verlauf der cyclo-AMP-Basalspiegel und der durch Adenosin stimulierten cyclo-AMP-Bildung also ein Adaptionsvorgang zugrunde. Bei einer Verwendung von Diazepam zur Epilepsiebehandlung am Menschen, wo das Medikament ebenfalls über einen längeren Zeitraum gegeben wird, wird von einer Gewöhnung nach einiger Zeit berichtet (22), so daß, um die Krampfanfälle weiterhin zu unterdrücken, die Dosis erhöht werden mußte. Diese Übereinstimmung der hier gefundenen Versuchsergebnisse mit dem klinischen Bild schließt deshalb nicht aus, daß an der biochemischen Wirkung von Diazepam die Erhöhung der cyclo-AMP-Basalspiegel und der adenosinabhängigen cyclo-AMP-Bildung über einen der hier diskutierten Mechanismen beteiligt sein könnte.

Scollo-Lavizzari beschreibt die Wirkung der Benzodiazepine als Potenzierung der normalen hemmenden synaptischen Aktivität und damit einer Herabsetzung der Erregbarkeit der Neurone (55). In der vorliegenden Untersuchung wurde unter bestimmten Voraussetzungen eine Anhäufung von cyclo-AMP gefunden, die eine verlängerte Refraktärphase hervorruft (17,18,38,39), und so eine verminderte Entladungsfrequenz bewirkt. Diese verminderte Entladungsfrequenz in Verbindung mit einem durch Adenosin erniedrigten postsynaptischen Potential gibt zu der Vermutung Anlaß, daß neben der "Potenzierung der hemmenden synaptischen Aktivität" die excitatorische synaptische Aktivität im limbischen Cortex unterdrückt wird.

In einer Studie von Davis et al. wird berichtet, daß Diazepam die Atmung und oxydative Phosphorylierung in den Mitochochondrien des Rattengehirns erniedrigt und damit wahrscheinlich eine Verminderung der subzellulären Funktion im ZNS zur Folge hat (9). Dies ist eine zusätzliche Möglichkeit der Wirkungsentfaltung, über die vielleicht die Sofortwirkung innerhalb kürzerer Zeit vermittelt wird. Dieser Mechanismus allein kann allerdings die klinische Beobachtung der Gewöhnung nicht erklären.

Diese Gedanken sind zum Teil noch sehr spekulativ. Zur Erhärtung der genannten Vermutungen sind deshalb weitere Untersuchungen nötig.

Am 19. Oktober 1975 veröffentlichte die New York Times einen Artikel mit der Überschrift:
Valium das meistmißbrauchte Arzneimittel (New York Times vom 19. Oktober 1975, S.67). Darin wird berichtet, daß etwa vier Fünftel der Abhängigen von weichen Drogen und ein Viertel der Heroinsüchtigen dauernd das Medikament einnehmen. Weiter wird von 17o medizinisch Kranken einer Stichprobe berichtet, von denen 65 % für sechs Monate oder länger Diazepam verschrieben bekamen.

In dieser Zeitungsnotiz ist die Gefahr schon beschrieben. Das Medikament wird häufig zur Überwindung von Angstzuständen gegeben. Durch die Gewöhnungserscheinung muß die Dosis immer weiter erhöht werden, um den gleichen therapeutischen Erfolg zu erreichen. Gerade bei Psychopharmaka ist die Suchtgefahr besonders groß, da sie den Patienten in eine Scheinwelt versetzen, die angenehmer als die Realität ist. Dies trifft in besonderem Maße bei Rauschgiftsüchtigen zu.

Bei Verwendung von Diazepam in der Zahnheilkunde sind keine Nachteile in den hier angesprochenen Bereichen zu erwarten, da in diesem Anwendungsgebiet nur kurzfristig Applikationen angezeigt sind.

VI. Zusammenfassung

Männliche Ratten wurden bis zu 21 Tage mit 2o mg/kg/die Diazepam vorbehandelt. Nach unterschiedlicher Behandlungsdauer wurden die Tiere getötet, das Gehirn herausgenommen und Gewebeschnitte von Cortex cerebri sowie Mittelhirn und Basalganglien hergestellt. In diesen Schnitten wurde die cyclo-AMP-Bildung mit Noradrenalin und in Cortexschnitten auch mit Adenosin stimuliert. Bei Stimulierung mit Noradrenalin konnten weder in Schnitten des Cortex cerebri noch in Schnitten des Mittelhirns und der Basalganglien signifikante Veränderungen der cyclo-AMP-Bildung beobachtet werden. Wurde jedoch die cyclo-AMP-Bildung in Schnitten des Cortex cerebri mit Adenosin stimuliert, so wurde am Tag 3 nach Beginn der Vorbehandlung mit Diazepam eine signifikant erhöhte Anhäufung von cyclo-AMP festgestellt. Ebenso am Tag 3 nach Beginn der Vorbehandlung mit Diazepam wurden signifikant erhöhte cyclo-AMP-Basalspiegel in Schnitten des Cortex cerebri gefunden. In der Folgezeit konnte eine Abnahme sowohl bei der adenosinabhängigen cyclo-AMP-Bildung wie auch bei den cyclo-AMP-Basalspiegeln beobachtet werden: es trat möglicherweise eine Gewöhnungserscheinung auf.

Auch mit unvorbehandelten Ratten wurden Experimente durchgeführt. Nach der Entnahme des Gehirns wurden Gewebeschnitte vom Cortex cerebri hergestellt und mit Noradrenalin und Adenosin in Anwesenheit von Diazepam und Desmethyldiazepam inkubiert. Die Konzentration der Medikamente in der Inkubationslösung wurde mit 3 µg/ml so gewählt, wie sie der tatsächlich im Organismus der Tiere erreichten nahekommt. Dabei erhielt man bei der Inkubation Noradrenalin + Diazepam eine signifikant erhöhte cyclo-AMP-Anhäufung im Vergleich zur Inkubation mit Noradrenalin allein. Die Ergebnisse werden diskutiert im Hinblick auf eine mögliche Beteiligung des cyclo-AMP-Systems am Wirkungsmechanismus von Diazepam.

VII. Literaturverzeichnis

1. Baird, E.S. and Flowerdew, G.D.: Intravenous diazepam in conservativ dentistry
Brit. Dent. J. 128, 11 - 14 (197o)

2. Beer, B., Chasin, M., Clody, D.E., Vogel, J.R. and Horovitz, Z.P.: Cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase in brain: effect on anxiety
Science, 176, 428 - 43o (1972)

3. Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, T.H., Czok, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E. und Pfleiderer, G.Z.: Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang
Z. Naturforsch. 8b, 555 - 577 (1953)

4. Brown, P.R.H., Main, D.M.G. and Lawson, J.I.M.: Diazepam in dentistry
Brit.Dent. J. 125, 498 - 5o1(1968)

5. Butcher, R.W. and Sutherland, E.W.: Adenosine 3′,5′-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3′,5′-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3′,5′-phosphate in human urine
J. Biol. Chem. 237, 1244 - 1250 (1962)

6. Chasin, M., Rivkin, I., Mamrak, F., Samaniego, S.G. and Hess, S.M.: Alpha- and beta-adrenergic receptors as mediators of accumulation of cyclic adenosine 3′,5′-monophosphate in specific areas of guinea pig brain
J. Biol. Chem. 246, 3037 - 3041 (1971)

7. Chasin, M., Harris, D.N., Phillips, M.B. and Hess, S.M.: 1-Ethyl-4-(isopropylidenehydrazino)-1H-pyrazolo-(3,4-b)-pyridine-5-carboxylic acid, ethylester, hydrochloride (SQ 20009)- a potent new inhibitor of cyclic 3′,5′-nucleotide phosphodiesterases
Biochem. Pharmacol. 21, 2443 - 2450 (1972)

8. Corrodi, H., Fuxe, K., Lidbrink, P. and Olson, L.:
Minor tranquillizers, stress and central catecholamine neurons
Brain Res. 29, 1 - 16 (1971)

9. Davis, L.F., Gatz, E.E. and Jones, J.R.:
Effects of chlordiazepoxide and diazepam on respiration and oxidative phosphorylation in rat brain mitochondria
Biochem. Pharmacol. 2o, 1883 - 1887 (1971)

1o. Deguchi, T. and Axelrod, J.:
Supersensitivity and subsensitivity of the -adrenergic receptor in pineal gland regulated by catecholamine transmitter
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 7o, 2411 - 2414 (1973)

11. Dominic, J.A., Sinha, A.K. and Barchas, J.D.:
Effect of benzodiazepine compounds on brain amine metabolism
Europ. J. Pharmacol. 32, 124 - 127 (1975)

12. Fennessy, M.R. and Lee, J.R.:
The effect of benzodiazepines on brain amines of the mouse
Arch. int. Pharmacodyn. 197, 37 - 44 (1972)

13. Ganong, W.F.: Lehrbuch der med. Physiologie, übersetzt von W. Auerswald, 3. Aufl., Springer Verlag, Heidelberg, 1974

14. Garattini, S., Mussini, E., Marcucci, F. and Guaitani, A.: The benzodiazepines (Garattini, S., Mussini, E. and Randall, E.W., eds.) Raven Press , New York,1973

15. Gilman, A.G.: A protein binding assay for adenosine 3',5'-cyclic monophosphate
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 67, 3o5 - 312 (197o)

16. Glowinski, J. and Iversen, L.L.:
Regional studies of catecholamines in the rat. I. The disposition of (3H) norepinephrine, (3H) dopamine and (3H) dopa in various regions of the brain
J. Neurochem. 13, 655 - 669 (1966)

17. Greengard, P., McAfee, D.A. and Kebabian, J.W.:
On the mechanism of action of cyclic AMP and its role in synaptic transmission
Advan. Cyclic Nucleotide Res. 1, 337 - 355 (1972)

18. Greengard, P. and Kebabian, J.W.:
Role of cyclic AMP in synaptic transmission in the mammalian peripheral nervous system
Fed. Proc. 33, 1o59 - 1o67 (1974)

19. Healy, T.E.J., Edmondson, H.D. and Hall, N.:
The use of intravenous diazepam during dental surgery in the mentally handicapped patient
Brit. Dent. J. 128, 22 - 24 (197o)

2o. Healy, T.E.J., Robinson, J.S. and Vickers, M.D.:
Physiological responses to intravenous diazepam as a sedative for conservative dentistry
Brit. Med. J. 3, 1o - 13 (197o)

21. Healy, T.E.J. and Hamilton, M.C.:
Intervenous diazepam in the apprehensive child
Brit. Dent. J. 13o, 25 - 27 (1971)

22. Hillestad, L., Hansen, T. and Meslom, H. :
Diazepam metabolism in normal man. II. Serum concentration and clinical effect after oral administration and cumulation
Clin. Pharmacol. Ther. 16, 485 - 489 (1974)

23. Honda, F. and Imamura, H.:
Inhibition of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase by phenothiazine and reserpine derivates
Biochim. Biophys. Acta 161, 267 - 269 (1968)

24. Huang, M., Shimizu, H. and Daly, J.W.:
Regulation of adenosine cyclic 3',5'-phosphate formation in cerebral cortical slices. Interaction among norepinephrine, histamine, serotonine
Mol. Pharmacol. 7, 155 - 162 (1971)

25. Huang, M. and Daly, J.W.:
Accumulation of cyclic adenosine monophosphate in incubated slices of brain tissue. 1. Structure-activity relationships of agonists and antagonists of biogenic amines and of tricyclic tranquillizers and antidepressants
J. Med. Chem. 15, 458 - 462 (1972)

26. Huang, M., Ho, A.K.S. and Daly, J.W.:
Accumulation of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate in rat cerebral cortical slices. Stimulatory effects of alpha and beta adrenergic agents after treatment with 6-hydroxydopamine, 2, 3, 5-trihydroxyphenylethylamine and dihydroxytryptamines
Mol. Pharmacol. 9, 711 - 717 (1973)

27. Hughes, G.: Diazepam in the dental surgery
Ann. roy. Coll. Surg. Engl. 48,
38 - 39 (1971)

28. Jacobs, E.E., Jacob, M., Sanadi, D.R. and Bradley, L.B.:
Uncoupling of oxidative phosphorylation by cadmiumion
J. Biol. Chem. 223, 147 - 156 (1956)

29. Jenner, P., Chadwick, D., Reynolds, E.H. and Marsden, C.D.: Altered 5-HT metabolism with clonazepam, diazepam and diphenylhydantoin
J. Pharm. Pharmacol. 27, 7o7 - 71o (1975)

3o. Kakiuchi, S. and Rall, T.W.:
The influence of chemical agents on the accumulation of adenosine 3',5'-phosphate in slices of rabbit cerebellum
Mol. Pharmacol. 4, 367 - 378 (1968)

31. Kakiuchi, S. and Rall, T.W.:
Studies on adenosine 3',5'-phosphate in rabbit cerebral cortex
Mol. Pharmacol. 4, 379 - 388 (1968)

32. Kakiuchi, S., Rall, T.W. and McIlwain, H.:
The effect of electrical stimulation upon the accumulation of adenosine 3',5'-phosphate in isolated cerebral tissue
J. Neurochem. 16, 485 - 491 (1969)

33. Kalisker, A., Rutledge, C.O. and Perkins, J.P.: Effect of nerve degeneration by 6-hydroxydopamine on catecholamine-stimulated adenosine 3′,5′-monophosphate formation in rat cerebral cortex Mol. Pharmacol. 9, 619 - 629 (1973)

34. Karlson, P.: Lehrbuch der Biochemie, 8. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, 1972

35. Keidel, W.D.: Kurzgefaßtes Lehrbuch der Physiologie, Thieme Verlag, Stuttgart, 1974

36. Kuroda, Y. and Kobayashi, K.: Effects of adenosine and adenine nucleotides on the postsynaptic potential and on the formation of cyclic adenosine 3′,5′-monophosphate from radioactive adenosine triphosphate in guinea pig olfactory cortex slices Proc. Japan Acad. 51, 495 - 500 (1975)

37. Lidbrink, O., Corrodi, H., Fuxe, K. and Olson, L.: Barbiturates and meprobamate: decreases in catecholamine turnover of central dopamine and noradrenaline

38. MacLean, P.D.: The limbic system and its hippocampal formation. Studies in animals and their possible application to man
J. Neurosurg. 11, 29 - 41 (1954)

39. McAfee, D.A., Schorderet, M. and Greengard, P.: Adenosine 3',5'-monophosphate in nervous tissue: increase associated with synaptic transmission
Science 171, 1156 - 1158 (1971)

4o. McAfee, D.A. and Greengard, P.: Adenosine 3',5'-monophosphate: electrophysical evidence for a role in synaptic transmission
Science 178, 31o - 312 (1972)

41. Muschek, L.D. and McNeill, J.H.: The effect of tricyclic antidepressants and promethazine on 3',5'-cyclic-AMP phosphodiesterase from rat brain
Fed. Proc. 3o, 33o, abs 773 (1971)

42. Okada, Y. and Kuroda, Y. :
Inhibitory action of adenosine and adenine nucleotides on the postsynaptic potential of olfactory cortex slices of the guinea pig
Proc. Japan Acad. 51, 491 - 494 (1975)

43. O'Neil, R., Verrill, P.J., Aellig, W.H. and Laurence, D.R.: Intravenous diazepam in minor oral surgery
Brit. Dent. J. 128, 15 - 18 (197o)

44. Perkins, J.P. and Moore, M.M.:
Characterization of the adrenergic receptors mediating a rise in cyclic 3',5'-monophosphate in rat cerebral cortex
J. Pharmacol. Exp. Ther. 185, 371 - 378 (1973)

45. Rall, T.W. and Kakiuchi, S., in: Molecular basis of some aspects of mental activity (Walaas, O., editor) Vol. 1, Academic Press, London, 1966

46. Rall, T.W. and Sattin, A., in: Advances in Biochemical Psychopharmacology (Costa, E. and Greengard, P. eds.) Vol. 3, Raven Press,New York, 197o

47. Roberts, E. and Simonsen, D.G.:
Some properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase of mouse brain: effects of imidazole-4-acetic acid, chlorpromazine, cyclic 3',5'-GMP, and other substances
Brain Res. 24, 91 - 111 (197o)

48. Sattin, A. and Rall, T.W.:
The effect of adenosine and adenine nucleotides on the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate content of guinea pig cerebral cortical slices
Mol. Pharmacol. 6, 13 - 23 (197o)

49. Schildkraut, J.J. and Kety, S.S.:
Biogenic amines and emotion
Science 156, 21 - 3o (1967)

5o. Schultz, J.: Adenosine 3',5'-monophosphate in guinea pig cerebral cortical slices: effect of benzodiazepines
J. Neurochem. 22, 685 - 69o (1974)

51. Schultz, J.: Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in guinea pig cerebral cortical slices: possible regulation of phosphodiesterase activity by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and calcium ions
J. Neurochem. 24, 495 - 5o1 (1975)

52. Schultz, J. and Daly, J.W.:
Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in guinea pig cerebral cortical slices. I. Formation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate from endogenous adenosine triphosphate and from radioactive adenosine triphosphate formed during a prior incubation with radioactive adenine
J. Biol. Chem. 248, 843 - 852 (1973)

53. Schultz, J. and Daly, J.W.:
Accumulation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in cerebral cortical

slices from rat and mouse. Stimulatory effect of alpha- and beta-adrenergic agents and adenosine.
J. Neurochem. 21, 1319 - 1326 (1973)

54. Schultz, J. and Hamprecht, B.:
Adenosine 3',5'-monophosphate in cultured neuroblastoma cells: effect of adenosine, phosphodiesterase inhibitors and benzodiazepines
Naunyn-Schmiedebergs Archs. exp. Path. Pharmac. 278, 215 - 225 (1973)

55. Scollo-Lavizzari, E.:
Biochemische Aspekte und allgemeine Prinzipien der antikonvulsiven Therapie
Praxis 39, 1207 - 1212 (1972)

56. Shimizu, H., Creveling, C.R. and Daly, J.W.:
Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate formation in brain slices: stimulation by batrachotoxin, ouabain, veratridine, and potassium ions
Mol. Pharmacol. 6, 184 - 188 (1970)

57. Shimizu, H., Tanaka, S., Suzuki, T. and Matsukado, Y.:
The response of human cerebrum adenyl cyclase to biogenic amines
J. Neurochem. 18, 1157 - 1161 (1971)

58. Skolnick, P. and Daly, J.W.:
Norepinephrine-sensitive adenylate cyclase in rat brain: relation to behaviour and tyrosine hydroxylase
Science 184, 175 - 177 (1974)

59. Sutherland, E.W., Rall, T.W. and Menon, T.J.:
Adenyl cyclase. I. Distribution, preparation, and properties
J. Biol. Chem. 237, 122o - 1227 (1962)

6o. Triadan, H., Zbinden, Ch. und Röttig, E.:
Prämedikation überängstlicher Patienten in der zahnärztlichen Praxis
Schweiz. Mschr. Zahnheilk. 8o,
1213 - 1234 (197o)

61. Weiss, B. and Kidman, A.D., in: Advances in Biochemical Psychopharmacology (Costa, E. and Greengard, P. eds.) Vol. 1,
Raven Press, New York, 1969

An dieser Stelle möchte ich
Herrn Prof.Dr. Schultz sehr herzlich
danken für die Überlassung des Themas,
die jederzeit hilfreiche Betreuung und
die zahlreichen Anregungen zur Durchführung der Experimente und zur Abfassung
der Arbeit.

Ebenfalls sehr herzlich danken möchte
ich Fräulein Gertrud Kleefeld für die
tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Herrn Prof.Dr. Schultz und Fräulein
Gertrud Kleefeld zusammen, möchte ich
sehr herzlich danken für die Durchführung der cyclo-AMP-Bestimmung nach
Gilman.

L E B E N S L A U F

Am 4. Mai 1952 wurde ich, Werner Adolf Nothelfer, als Sohn des Franz Nothelfer und seiner Ehefrau Rosa-Maria geb. Koßbiel in Bad Dürrheim geboren. Von 1959 - 1963 besuchte ich die Grundschule in Calw, von 1963 -1971 das Hermann Hesse - Gymnasium, ebenso in Calw, wo ich auch das Abitur ablegte. Im Wintersemester 1971/72 begann ich mit dem Studium der Zahnheilkunde an der Eberhard - Karls - Universität in Tübingen. 1972 legte ich das Vorphysikum ab, 1974 das Physikum. Am 1. Dezember 1976 bestand ich die zahnärztliche Prüfung vor dem Prüfungsausschuß in Tübingen.